Рекомендована д. фармац. наук, проф. І. А. Мазуром
УДК 615.411:633.884.271+543.544]-004

ЗАСТОСУВАННЯ ХРОМАТОГРАФІЧНИХ МЕТОДІВ ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ НАСТОЙКИ ВАЛЕРІАНИ

©Л. В. Вронська

Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського

Резюме: проведено дослідження якісного і кількісного складу сесквітерпенових кислот методами ТШХ і ВЕРХ. Встановлено, що для ідентифікації настойки валеріани необхідно проводити виявлення валеренової та гідроксивалеренової кислот. Кількісний вміст сесквітерпенових кислот у вітчизняних зразках настойок валеріани коливається у широких межах ($2{,}96 \cdot 10^{-4}$ % до 0,028 %), тому він не може бути використаний як кількісний критерій якості настойки.

Ключові слова: настойка валеріани, хроматографічні методи, сесквітерпенові кислоти, ідентифікаційні маркери якості.

Вступ. Високоселективні хроматографічні методи – газова, тонкошарова і високоефективна рідинна хроматографія (ТШХ і ВЕРХ) займають чільне місце в монографіях останніх редакцій провідних фармакопей світу для контролю якості лікарської рослинної сировини і рослинних препаратів [1–4] і в зв'язку з гармонізацією Державної Фармакопеї України (ДФУ) з Європейською Фармакопеєю (ЄФ), все частіше застосовуються у специфікаціях виробників. Настойка валеріани належить до засобів з тривалим позитивним досвідом застосування, проте підвищені вимоги до якості рослинних препаратів і зміна нормативної документації на сировину – корені валеріани лікарської, зумовлюють необхідність перегляду аналітичної документації на даний лікарський засіб.

Вітчизняні виробники настойки валеріани, з ряду об'єктивних причин, здійснюють ідентифікацію біологічно активних речовин (БАР) валеріани методом тонкошарової хроматографії без свідків, без вказівки на означення БАР, зони яких проявляються на ТШХ-хроматограмі та з використанням неселективних проявників. Звичайно, що такий підхід можна виправдати відсутністю і високою вартістю стандартних речовин для ідентифікації, наприклад, сесквітерпенових кислот, і, власне, самого аналітичного забезпечення хроматографічного аналізу. Проте у ДФУ 1.2 [3] наведено монографію на корені валеріани, згідно з якою у сировині для виробництва препаратів валеріани повинні бути присутні валеренова і гідроксивалеренова кислоти, а при кількісному визначенні вміст суми валеренової і ацетоксивалеренової кислот повинен бути не менше 0,17 % (вимоги ЄФ) або не менше 0,10 % (вимоги національного доповнення). У ЄФ наведено монографію на настойку валеріани, у якій обов'язковою є ідентифікація (ТШХ) і кількісне визначення (ВЕРХ) валеренової і ацетоксивалеренової кислот [4].

Мета роботи – дослідження можливостей застосування хроматографічних методів для ідентифікації біологічно активних речовин валеріани лікарської у її настойках вітчизняного виробництва, вибір ідентифікаційних маркерів як показників якості та напрацювання критеріїв якості.

Методи дослідження. Дослідження проводили на 10 зразках настойки валеріани 5 вітчизняних виробників ВАТ "Тернофарм" (три серії), ЗАТ фармацевтична фабрика "Віола" (три серії), ВАТ "Фітофарм" (м. Артемівськ) (одна серія), ТОВ ДКП "Фармацевтична фабрика", м. Житомир (1 серія), ДП "Агрофірма Ян" ПП "Ян" (2 серії).

Вивчення якісного складу сесквітерпенових кислот у настойках проводили методами ТШХ і ВЕРХ із застосуванням хроматографічних систем, описаних в ДФУ [3] для коренів валеріани або в ЄФ 7 видання [4] для настойки валеріани.

У роботі використано первинний стандартний зразок валеренової кислоти з вмістом 99,7 % (HWI ANALYTIK GMBH). Інші використані для досліджень реактиви відповідали вимогам ДФУ щодо кваліфікації чистоти, їхнє приготування проводилось згідно з ДФУ або приводиться при описі методик.

Результати й обговорення. Згідно з вимогами ДФУ [3], при контролі якості коренів валеріани застосовують ТШХ-методику ідентифікації сесквітерпенових кислот. Відповідно до цієї методики отримують метанольне вилучення з коренів валеріани, його очищають від ліпофільних речовин у лужному середовищі, проводять лужний гідроліз присутніх у витязі естерів, відокремлюють отримані кислоти шляхом екстракції з кис-

лого середовища та ідентифікують методом ТШХ гідроксивалеренову та валеренову кислоти.

Для ідентифікації цих кислот у настойці валеріани дослідили умови і можливості їх відокремлення і виділення, для чого фармакопейну методику адаптували для аналізу настойки. Встановлено, що для ТШХ-ідентифікації сесквітерпенових кислот оптимальним є об'єм досліджуваної настойки 5 мл: при менших кількостях проби не завжди вдається виявляти необхідні зони визначуваних речовин. При більшому об'ємі настойки, взятої для аналізу, важким є розділення шарів при екстракційному очищенні від ліпофільних речовин і при екстракційному виділенні сесквітерпенових кислот – допомагає лише центрифугування проб у присутності насиченого розчину натрію хлориду, що неминуче призводить до втрат.

Оптимальний об'єм проб, підготовлених відповідним чином, для нанесення на пластинку становить 20 мкл – більший об'єм спричиняє накладання смуг БАР, погіршується їх розділення, внаслідок перевантаження хроматографічного шару.

Крім того, нами було досліджено, що час нагрівання пластинки після обробки розчином анісового альдегіду слід скоротити до 3–4 хв, порівняно з фармакопейною вимогою – 5–10 хв, оскільки в останньому випадку спочатку спостерігають почервоніння шару сорбенту, обробленого розчином реактиву, а потім і почорніння.

Детально відпрацювавши методику ідентифікації сесквітерпенових кислот у настойці валеріани, пропонуємо її у наступній редакції.

Методика ідентифікації сесквітерпенових кислот (валеренової і гідроксивалеренової) у настойці валеріани методом тонкошарової хроматографії.

Випробовуваний розчин. 5,0 мл настойки валеріани випарюють на водяній бані при температурі не вище 40 °С до об'єму близько 1,5 мл, додають 3 мл розчину 100 г/л калію гідроксиду Р і струшують із двома порціями, по 5 мл кожна, хлороформу Р. Після розшарування нижній шар зливають. Водний шар (верхній) поміщають у випарювальну чашку і нагрівають на водяній бані при температурі 40 °С протягом 10 хв, охолоджують, додають кислоту хлористоводневу розведену Р до кислої реакції (за універсальним індикаторним папірцем) та струшують із двома порціями, по 5 мл кожна, хлороформу Р. Об'єднані нижні шари фільтрують через паперовий фільтр з 3 г натрію сульфату безводного Р, попередньо змоченого хлороформом Р. Одержаний фільтрат випарюють насухо, залишок розчиняють в 1,0 мл метанолу Р.

Розчин порівняння. 5,0 мг флуоресцеїну Р та 5,0 мг судану червоного G Р розчиняють у 20,0 мл метанолу Р.

На лінію старту хроматографічної пластинки окремо смугами по 10 мм наносять 20 мкл випробуваного розчину та 20 мкл розчину порівняння. Пластинку поміщають у камеру із сумішшю розчинників кислота оцтова льодяна Р – етилацетат Р – гексан Р (0,5:35:65). Коли фронт розчинників пройде 10 см від лінії старту, пластинку виймають із камери, сушать на повітрі та переглядають при денному світлі. На хроматограмі розчину порівняння мають виявлятися: у середній частині – червона зона, відповідна судану червоному G, у нижній частині – зеленувато-жовта зона, відповідна флуоресцеїну. Пластинку обприскують розчином анісового альдегіду Р, нагрівають при температурі від 100 до 105 °С протягом 3–4 хв і переглядають при денному світлі. На хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися: фіолетово-синя зона, відповідна гідроксивалереновій кислоті, на рівні зони, відповідній флуоресцеїну на хроматограмі розчину порівняння, і фіолетова зона, відповідна валереновій кислоті, на рівні зони, відповідній судану червоному G на хроматограмі розчину порівняння. На хроматограмі випробовуваного розчину у верхній частині мають виявлятися інші, менш інтенсивні, зони від рожевого до фіолетового кольору.

У вибраних і відпрацьованих умовах пробопідготовки і хроматографування отримано хроматограми, аналіз за якими наведено у таблиці 1.

Таблиця 1. Результати ідентифікації валеренової і гідроксивалеренової кислот у настойках валеріани різних виробників

Смуга	№ зр.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Фіолетова (валеренова кислота) на рівні зони судану червоного G)	слабка	сильна	сильна	слабка	сильна	сильна	середньої інтенсивності	слабка	середньої інтенсивності	слабка
Синьо-фіолетова (гідроксивалеренова кислота) на рівні зони флуоресцеїну	слабка	сильна	сильна	слабка	сильна	сильна	середньої інтенсивності	слабка	середньої інтенсивності	слабка

Як випливає з наведених у таблиці 1 результатів, валеренова і гідроксивалеренова кислоти ідентифікуються у всіх досліджуваних зразках настойок, однак що є принциповим: в одних зразках ці зони спостерігаються сильної інтенсивності, а в інших – слабкої інтенсивності. Це вказує на можливі відмінності у якості сировини, використовуваної різними виробниками, але прослідковуючи якість різних серій одного виробника, можна припускати і недостатній рівень валідності технології настойки валеріани, через застаріле обладнання для фітохімічного виробництва.

Таким чином, розроблена нами методика принципово може застосовуватись для об'єктивного встановлення тотожності настойки валеріани, через ідентифікацію її маркерів – валеренової і гідроксивалеренової кислот. Ідентифікаційним критерієм якості настойки валеріани є присутність на ТШХ- хроматограмах зони кислоти валеренової та зони кислоти гідроксивалеренової.

Ідентифікацію настойки валеріани за вимогами ЄФ 7-го видання [4] здійснюють через встановлення присутності валеренової та ацетоксивалеренової кислот методом тонкошарової хроматографії. Відхід від ідентифікації гідроксивалеренової кислоти як продукту гідролізу тієї ж ацетоксивалеренової кислоти, є наслідком висунення жорсткіших вимог до якості як сировини, так і лікарських засобів на її основі. У ЄФ [4] змінено вимоги і до коренів валеріани – забравши попередній гідроліз естерів валеріани з пробопідготовки випробовуваного розчину для ТШХ-аналізу, узгодили вимоги до сировини і до препарату. Тобто, якість настойки має підтверджуватись присутністю у її складі вільних валеренової і ацетоксивалеренової кислот, які також повинні ідентифікуватись і в коренях валеріани.

Принципова відмінність від розробленої нами методики – відсутність гідролізу, розділення, виділення і концентрування сесквітерпенових кислот. Згідно з вимогами [4] 5 мл настойки розбавляється до 10 мл 70 % спиртом етиловим та наноситься на пластинку. Для об'єктивності ідентифікації як розчин порівняння вимагається застосувати розчин, що містить стандартні зразки речовин-свідків: валеренової і ацетоксивалеренової кислот. Крім того, для кращого розділення БАР зменшено неполярність рухомої фази – зменшено вміст гексану і він замінений на циклогексан, збільшено вміст льодяної оцтової кислоти і етилацетату.

При випробуванні вітчизняних зразків настойки валеріани в умовах, наведених у ЄФ на настойку валеріани, нами отримано хроматограми, аналіз яких представлено у таблиці 2.

Таблиця 2. Результати ідентифікації валеренової і ацетоксивалеренової кислот у настойках валеріани різних виробників за методикою ЄФ

Пляма, R_f	№ зр.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Синя	0,14	0,14	0,15	-	0,15	-	0,14	0,14	-	-
Рожево-фіолетова	0,19	0,19	0,20	0,19	0,18	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
Фіолетова	-	-	-	-	-	-	0,29	-	-	-
Жовта	0,34	-	0,35	-	-	0,34	0,34	0,34	-	0,34
Синя	-	0,38	-	-	0,38	-	-	-	-	-
Синя	**0,43** дуже слабка	**0,43** сильна	**0,43** дуже слабка	-	**0,43**	**0,42** сильна	**0,42** дуже слабка	**0,42** дуже слабка	-	**-**
Рожева (рожево-фіолетова	0,49	0,47	0,47	-	0,47	0,48	0,48	0,48	-	0,47
Синьо-фіолетова	**0,53** слабка	**0,53** дуже сильна	**0,53** дуже слабка	**0,53** дуже слабка	**0,53**	**0,53** дуже сильна	**0,52** слабка	**0,52** слабка	**0,53** дуже слабка	**0,53** дуже слабка
Синя	- 0,73	0,67 0,73	0,67 0,72	слабка -	- 0,72	- -	- 0,72	- 0,72	слабка -	- -

Примітки: валеренова кислота – R_f = 0,52-0,53; ацетоксивалеренова кислота – R_f = 0,42-0,43

Аналізуючи результати ТШХ-випробувань настойок валеріани різних виробників, можна зробити декілька висновків. Усі випробувані зразки ідентифікуються як настойки валеріани, завдяки наявності кислоти валеренової (R_f=0,53) сильнішої або дуже слабкої інтенсивності. Кислота ацетоксивалеренова (R_f=0,41-0,43) міститься у кількостях, які можуть бути ідентифіковані методом тонкошарової хроматографії лише в семи з десяти випробуваних зразках настойок валеріани. Для всіх випробуваних зразків настойок виконується вимога щодо присутності однієї з двох слабких або дуже слабких зон у нижній частині пластинки (значно нижче зони ацетоксивалеренової кислоти) (R_f=0,19).

Таким чином, методика ідентифікації валеренової і ацетоксивалеренової кислот у настойках валеріани вітчизняних виробників лише частково витримує вимоги ЄФ [4], а саме ідентифікується валеренова кислота і ще одна речовина, рожево-фіолетова зона якої проявляється на хроматограмі випробовуваного розчину (R_f=0,19). На жаль, не всі проаналізовані зразки містили кислоту ацетоксивалеренову. Причини цього обговорювались нами вище як з точки зору якості сировини, так і валідності технології настойки. Але незважаючи на негативний результат ідентифікації ацетоксивалеренової кислоти в певних зразках, дана методика є простішою у виконанні, тому з окремими змінами критеріїв, порівняно із європейськими, може застосовуватись для встановлення тотожності настойки валеріани і бути введеною згодом – після гармонізації монографії у ДФУ на "Валеріани корені" з європейськими вимогами, у національне доповнення.

Досліджувані зразки настойок були проаналізовані методом ВЕРХ в умовах, описаних у ЄФ [4].

Випробовуваний розчин. 10,0 г настойки поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл і доводять об'єм розчину метанолом Р1 до позначки, перемішують.

Розчин порівняння. 1,0 мг стандартного зразка кислоти валеренової поміщають у мірну колбу місткістю 10,0 мл, додають метанол Р1, розчиняють і доводять об'єм розчину до позначки тим самим розчинником, перемішують.

Колонка: XTerra RP 18 або аналогічна, яка задовольняє наступним вимогам:

– розмір: l = 0,25 м x 4,6 мм;

– нерухома фаза: силікагель октадецилсилильний для хроматографії Р(5 мкм).

Рухома фаза:

– рухома фаза А: ацетонітрил Р1, 5 г/л розчину фосфорної кислоти Р (20:80);

– рухома фаза В: 5 г/л розчину фосфорної кислоти Р, ацетонітрил Р1 (20:80).

Режим елюювання представлено у таблиці 3.

Таблиця 3. Програма елюювання при визначенні сесквітерпенових кислот у настойці валеріани

Час (хв)	Рухома фаза А (%)	Рухома фаза В (%)
0 – 5	55	45
5 – 18	55 – 20	45 – 80
18 – 22	20	80

Швидкість рухомої фази: 1,5 мл/хв.

Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 220 нм.

Об'єм проби: 20 мкл.

Ідентифікація піків: використовують хроматограму випробуваного розчину і хроматограму, отриману для розчину порівняння для ідентифікації піків ацетоксивалеренової і валеренової кислоти.

Придатність хроматографічної системи: відносний час утримування ацетоксивалеренової кислоти порівняно з валереновою кислотою (час утримування – близько 15 хв) близько 0,5 за хроматограмою розчину порівняння.

Розрахунок відсоткового вмісту сесквітерпенових кислот у перерахунку на валеренову кислоту проводять за формулою:

$$X = \frac{(A_1 + A_2) \cdot m_0 \cdot p \cdot 5}{A_0 \cdot m \cdot 100} \cdot 100 = \frac{(A_1 + A_2) \cdot m_0 \cdot p \cdot 5}{A_0 \cdot m},$$

де A_1 – площа піку ацетоксивалеренової кислоти на хроматограмі випробовуваного розчину;

A_2 – площа піку валеренової кислоти на хроматограмі випробовуваного розчину;

A_0 – площа піку валеренової кислоти на хроматограмі розчину порівняння;

m – маса настойки валеріани, використана для приготування випробовуваного розчину, в грамах;

m_0 – маса наважки стандартного зразка валеренової кислоти, використаної для приготування розчину порівняння, в грамах;

p – вміст валеренової кислоти в стандартному зразку, у відсотках.

Зразки отриманих хроматограм для стандартного розчину кислоти валеренової та певних зразків настойок валеріани наведено на рисунках 1–3.

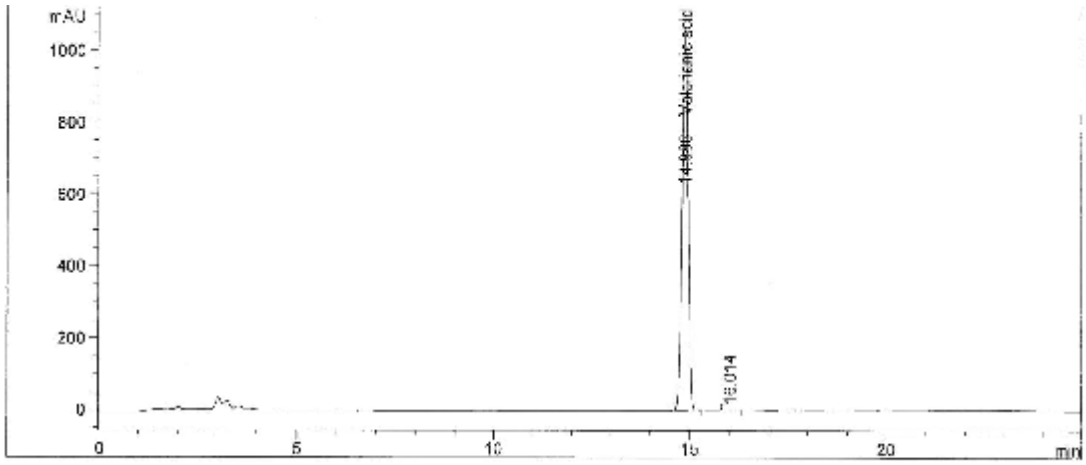

Рис. 1. Хроматограма розчину порівняння (валеренова кислота).

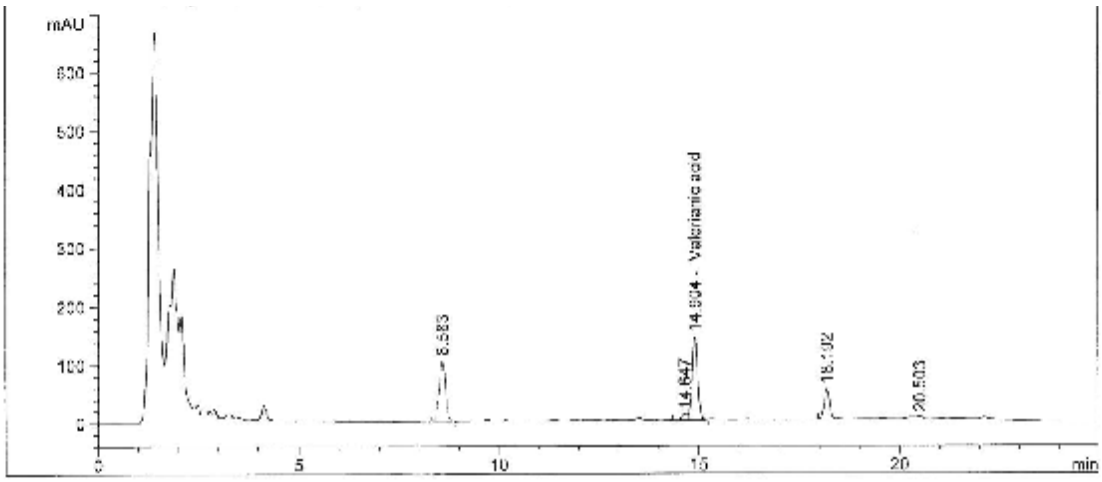

Рис. 2. Хроматограма випробовуваного розчину для зразка настойки № 6.

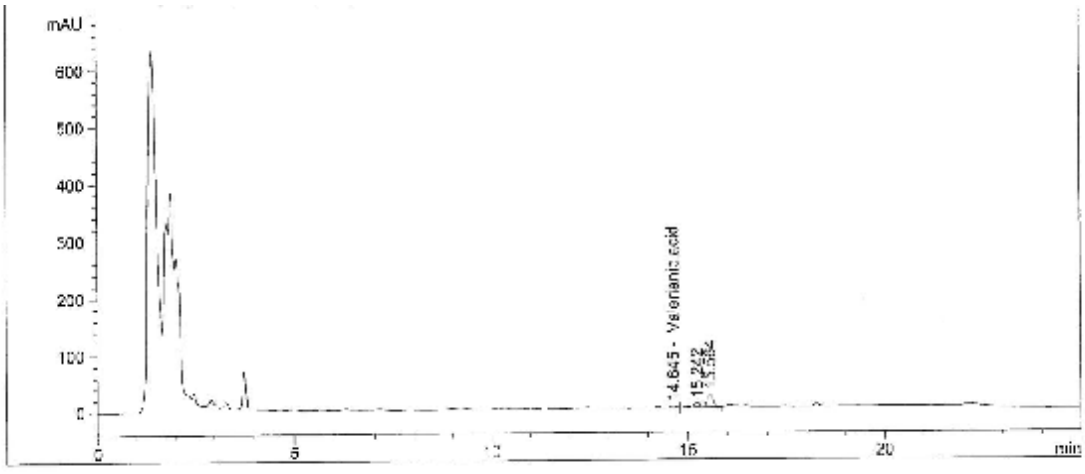

Рис. 3. Хроматограма випробовуваного розчину для зразка настойки № 10.

Результати ідентифікації методами ТШХ та ВЕРХ збігаються. Результати кількісного визначення вмісту суми сесквітерпенових кислот у настойках представлено у таблиці 4.

Таблиця 4. Результати визначення вмісту сесквітерпенових кислот у настойках валеріани різних виробників

№ зразка	Середня площа піку кислоти валеренової, A_2	Середня площа піку кислоти ацетоксивалеренової, A_1	Сума площ $A_1 + A_2$	Вміст, $x10^4$, %
1	39,94	32,53	72,47	7,9
2	1241,76	1219,32	2461,08	**268,7**
3	65,79	54,61	120,4	13,2
4	27,14	-	27,14	2,96
5	369,23	299,69	668,92	73,0
6	1417,69	1169,34	2587,03	**282,5**
7	151,56	105,98	257,54	28,1
8	43,55	24,88	68,43	7,47
9	32,15	-	32,15	3,51
10	35,14	-	35,14	3,84

Як випливає із наведених у таблиці 4 результатів, вміст суми сесквітерпенових кислот у настойці валеріани коливається у дуже широкому інтервалі: від $2,96 \cdot 10^{-4}$ до 0,028 %, тобто практично відмінність у 100 разів. За вимогами ЄФ [4] вміст суми сесквітерпенових кислот повинен бути не менше 0,015 % у перерахунку на кислоту валеренову. Два зразки настойок – 2 і 6 витримують цю вимогу, бо вміст становить 0,027 і 0,028 % відповідно. Причому зразок № 2 є якісним за цією вимогою, тоді як зразки № 1 і 3 цього ж виробника мають дуже малий вміст. Аналогічна ситуація із зразком настойки № 6, який витримує вимогу щодо вмісту сесквітерпенових кислот, тоді як зразок № 5 цього ж виробника має значно менший вміст. Така різниця пов'язана з рядом причин, серед яких відмінності у підходах та вимогах до якості сировини, відмінності у методах контролю якості вхідної сировини коренів валеріани, відмінності і нестійкість застосовуваних технологічних прийомів, що в кінцевому випадку дає значні флуктуації якісного і кількісного складу настойки навіть у межах одного виробництва.

Висновки. 1. Об'єктивна ідентифікація настойки валеріани може бути здійснена шляхом виявлення валеренової та гідроксивалеренової кислот після спеціальної пробопідготовки, яка включає гідроліз естерів та екстракцію сесквітерпенових кислот, методом ТШХ.

2. Ідентифікаційним маркером якості настойки валеріани пропонується наявність валеренової і гідроксивалеренової кислот.

3. Визначення вмісту сесквітерпенових кислот вказує на значні відмінності вітчизняних зразків настойок валеріани за даним показником, що свідчить про неможливість введення його як кількісного критерію на даний час.

Література

1. Аналіз методів стандартизації кореневищ із коренями валеріани та препаратів на їх основі за вмістом діючих речовин / О. В. Середа, Л. О. Середа, В. О. Бовтенко [та ін.] // Фармаком. – 2007. – № 2. – С. 41 – 54.

2. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-ше вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.

3. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-ше вид. – Доповнення 2. – Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.

4. European Pharmacopoeia. – 7-ed. – Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines, 2009. – 3357 p.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ НАСТОЙКИ ВАЛЕРИАНЫ

Л. В. Вронска

Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского

Резюме: проведено исследование качественного и количественного состава сесквитерпеновых кислот методами ТСХ и ВЭЖХ. Установлено, что для идентификации настойки валерианы необходимо проводить обнаружение валереновой и гидроксивалереновой кислот. Количественное содержание сесквитерпеновых кислот в

отечественных образцах настоек валерианы колеблется в широких пределах (2,96·10^{-4} до 0,028%), поэтому их содержание не может быть использовано как количественный критерий качества настойки.

Ключевые слова: настойка валерианы, хроматографические методы, сесквитерпеновые кислоты, идентификационные маркеры качества.

CHROMATOGRAPHIC METHODS APPLICATION FOR VALERIAN TINCTURE IDENTIFICATION

L. V. Vronska

Ternopil State Medical University by I. Ya. Horbachevsky

Summary: investigation of sesquiterpenic acids qualitative and quantitative composition was conducted by TLC and HPLC. It was found, that for identification of valerian tincture should be conducted, the discovery of valerenic and hydroxyvalerenic acids. Quantitative content of sesquiterpenic acids in native samples valerian tinctures varies widely (2,96·10^{-4} to 0.028 %), so it can't be used as a quantitative criterion of quality of tincture.

Key words: tincture of valerian, chromatographic methods, sesquiterpenic acids, markers of identification.